

CT/JP 98/04187

17.09.98

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 09 NOV 1998

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1997年 9月17日

出 願 番 号
Application Number:

平成 9年特許願第252541号

出 願 人
Applicant(s):

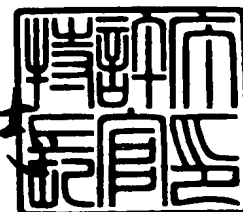
持田製薬株式会社
財団法人大阪バイオサイエンス研究所

PRIORITY DOCUMENT

1998年10月23日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平10-3084269

【書類名】 特許願

【整理番号】 MD0462

【提出日】 平成 9年 9月17日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 31/00

【発明の名称】 F a s リガンド誘導体

【請求項の数】 5

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市佐井寺2丁目21-17-511

【氏名】 長田 重一

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市佐井寺南ガ丘8-11-805

【氏名】 田中 正人

【特許出願人】

【識別番号】 000181147

【住所又は居所】 東京都新宿区四谷一丁目7番地

【氏名又は名称】 持田製薬株式会社

【代表者】 持田 英

【特許出願人】

【識別番号】 390000745

【住所又は居所】 大阪府吹田市古江台6丁目2番4号

【氏名又は名称】 財団法人 大阪バイオサイエンス研究所

【代表者】 佐治 敬三

【代理人】

【識別番号】 100080159

【郵便番号】 101

【住所又は居所】 東京都千代田区岩本町3丁目2番2号

千代田岩本

ビル4階

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡辺 望稔

【電話番号】 3864-4498

【選任した代理人】

【識別番号】 100090217

【郵便番号】 101

【住所又は居所】 東京都千代田区岩本町3丁目2番2号

千代田岩

本ビル4階

【弁理士】

【氏名又は名称】 三和 晴子

【電話番号】 3864-4498

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 006910

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9715033

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 Fasリガンド誘導体

【特許請求の範囲】

【請求項1】

プロテアーゼ抵抗性を有する新規Fasリガンド誘導体。

【請求項2】

配列番号1または2に記載したアミノ酸配列を含有する新規Fasリガンド誘導体。

【請求項3】

請求項1に記載の新規Fasリガンド誘導体をコードするDNA。

【請求項4】

請求項2に記載の新規Fasリガンド誘導体をコードするDNA。

【請求項5】

可溶型Fasリガンドを含有するアポトーシス調節剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、様々な疾患に関与するアポトーシスを制御することができるFasリガンドに関する。

【0002】

【従来の技術】

Fasリガンド（以下、FasLとする）はFasL、TNF、リンフォトキシン、TRAIL（TNF関連アポトーシス誘導リガンド）、CD40リガンド（CD40L）、CD27リガンド（CD27L）、CD30リガンド（CD30L）、およびOX40リガンド（OX40L）を含む腫瘍壊死因子（TNF）ファミリーに属す（ナガタ、Cell,88,355-365,1997；ウィリー等、Immunity,3,673-682、1995）。リンフォトキシンの α 鎖以外のTNFファミリーの大部分はII型の膜タンパク質として合成される。しかしFasLの可溶型、TNF α 、およびCD40Lはこれらの分子を発現する細胞の培養上清中で見つかり、これ

らのTNFファミリーの構成員は膜から切断（切り出）されることを示す（ペレ等、Cell,63,251-258,1990；ピエトラベール等、J.Biol.Chem.,271,5965-5967,1996b；タナカ等、EMBO J.,14,1129-1135,1995）。メタロプロテアーゼの阻害剤はTNF α と同様FasLの放出を妨げるので、メタロプロテアーゼが膜結合型FasLやTNF α がその可溶型を生み出すのに関与すると考えられた（ジャーリング等、Nature 370,555-557,1994；マックジーハム等、Nature,370,558-561,1994；モラー等、Nature,370,218-220,1994；タナカ等、Nature Med.2,317-322,1996）。最近、特異的にTNF α を切断するメタロプロテアーゼがADAMメタロプロテアーゼファミリーの一員として同定された（ブラック等、Nature 385,729-733,1997；モス等、Nature,385,733-736,1997）。これに対してTNFファミリー構成員の膜からの放出の生理学的役割は十分には解析されていない。

【0003】

FasLは、TNFレセプターファミリーの一員であり、かつCD95やAPO-1とも呼ばれる、そのレセプターFasに結合することによって、アポトーシスを引き起こす。FasLは、主として、ナチュラルキラー細胞（NK）と同様、活性化されたT細胞で発現し（アラセ等、J.Exp.Med.,181,1235-1238,1995；スダ等、J.Immunol.,154,3806-3813,1995；タナカ等、Nature Med.2,317-322,1996）、一方Fasは様々な細胞で普遍的に発現する（フレンチ等、J.Cell.Biol.335-343,1996；レーザンサー等、Lab.Invest.69,415-429,1993；スダ等、J.Immunol.,154,3806-3813,1995；ワタナベフクナガ等、J.Immunol.,148,1274-1279,1992）。FasやFasLが欠損しているマウスの分析によりFasLがCD8T細胞やCD4Th1型T細胞のような細胞障害性Tリンパ球（CTL）の主要作用分子の1つであることが示された（ハナブチ等、Proc.Natl.Acad.Sci.USA,91,4930-4934,1994；スダ等、J.Immunol.,154,3806-3813,1995；ビグノークスおよびゴルステン、Eur.J.Immunol.,24,923-927,1994）。CTLの役割はウイルスに感染した細胞や癌細胞を除去し、動物体内でウイルスや癌細胞が拡散増殖するのを防ぐことである。しかし、この系が過剰に作用したとき、組織の破壊が引き起こされる。肝炎、インシュリン依存性糖尿病、および甲状腺炎

(橋本病)のようなCTL介在自己免疫疾患ではFasLが誘導するアポトーシスに関与する可能性が示唆されてきた(シェルボンスキー等、Cell 89,17-24,1997; ジオルダノ等、Science,275,960-963,1997; コンドウ等、Nature Med.,3,409-413,1997)。

【0004】

上述のとおり、膜結合型FasLは切断されて可溶型になる。可溶型ヒトFasLは、少なくともFasを過剰に発現するマウスWR19L細胞形質転換体にアポトーシスを誘導する機能がある(タナカ等、EMBO J.,14,1129-1135,1995)。可溶型FasLは、NKリンパ腫、TやNK型の大型顆粒白血病患者の血清中で高値を示す(タナカ等、Nature Med.2,317-322,1996)。これらの白血病患者はしばしば肝炎や好中球減少症を呈するので、TNFで見られるとおり、FasLの可溶型が全身性組織破壊を引き起こすことが仮定される。一方、ヒト可溶型FasLの組み換え型をマウスに投与した際、Propionibacterium Acnesによる前処理でFasL誘導致死に対するマウスの感受性を挙げたにもかかわらず、大量のFasLが致死効果を示すのに必要であった(タナカ等、J.Immunol.,158,2303-2309,1997)。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

これらの結果は本発明者が可溶型と膜結合性のFasLの細胞障害活性を比較し、膜からのFasLの放出の生理学的役割を調べるきっかけとなった。

【0006】

本発明者は、発現するマウスのT細胞形質転換体の培養上清からヒトFasLを精製した。そのN末端配列分析により本発明者はヒトFasLの切断部位を決定できた。切断部位近傍のアミノ酸欠失変異は膜結合型FasLの切断を完全に阻害した。ヒトジャーカットT細胞株とマウス肝細胞はむしろ可溶型FasLに耐性があることがわかったが、それらは効率的に膜結合型FasLにより殺された。また、可溶型FasLは肝細胞に対する膜結合型FasL誘導細胞障害を阻害する。これらの結果はFasLの細胞膜からの放出はFasLの細胞障害活性をダウンレギュレートすることを示唆する。

【0007】

本発明はF a s アンタゴニストまたはアポトーシス調節物質として機能する可溶型F a s リガンド、アポトーシス誘導活性または細胞障害活性に優れた新規なF a s リガンド誘導体および該ペプチドをコードするDNAを提供しようとする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

F a s リガンドはII型の膜タンパク質であり、腫瘍壊死因子（TNF）ファミリーに属しており、レセプターであるF a s に結合することによりアポトーシスを誘発する。F a s Lは推定されるプロセッシング酵素であるメタロプロテアーゼにより切断され、可溶型のタイプを生じる。本発明者はヒトの可溶型F a s LをヒトのF a s Lを発現するマウス細胞の形質転換体の上清から精製し、その開裂箇所を特定した。開裂箇所近傍の4～23アミノ酸の欠失はヒトF a s Lの膜からの放出を妨げた。しかし、アポトーシスの誘導活性は保持していた。F a s を過剰に発現するマウスWR19L細胞はF a s Lの可溶型タイプと同様に、膜結合F a s Lに感受性がある。しかしながら、低濃度で内因性F a s を発現するジャーカット細胞やマウス初代培養肝細胞はむしろ可溶型F a s Lに耐性がある。膜結合型F a s Lがエフェクターとして用いられたとき、ヒトジャーカット細胞とマウス肝細胞は効率的に殺傷される。さらに、可溶型F a s Lはマウス肝細胞に対する膜結合型F a s Lの細胞障害性を阻害する。これらの結果は膜結合型は機能性の型で、その活性は膜からの可溶型F a s Lの放出によりダウンレギュレーションされることを示す。

【0009】

すなわち、本発明は、プロテアーゼ（蛋白分解酵素）に耐性の、又は抵抗性の、もしくは感受性の低下したF a s L誘導体、具体的には配列番号1または2に記載したアミノ酸配列を含有する新規F a s リガンド誘導体、およびこれらの新規F a s リガンド誘導体をコードするDNAを提供する。

さらに、本発明は、F a s アンタゴニストまたはアポトーシス調節物質として機能する可溶型F a s リガンド、および可溶型F a s リガンドを含有するアポト

ーシス調節剤を提供する。

【0010】

【発明の実施の態様】

本発明の第1の態様である新規F a s L誘導体は、プロテアーゼに対して耐性の、または抵抗性の、もしくは感受性の低下したF a s リガンド誘導体又は変異体である。特に、前記プロテアーゼが特にメタロプロテアーゼであり、および／または細胞膜結合型F a s Lを生体内又は試験管内で細胞から遊離する作用を有するプロテアーゼ、すなわちプロセッシング酵素である、F a s リガンド誘導体である。具体的には天然の膜結合型F a s Lのプロセッシング酵素による切断部位又はその近傍に何らかのアミノ酸残基の変異を有するもの、例えば、1以上のアミノ酸の欠失、置換または挿入、特に1以上、例えば4以上のアミノ酸の欠失を有するものがよい。本発明の新規F a s L誘導体には、F a s Lの細胞外領域中、F a s 結合性および／またはアポトーシス誘導能に必要な最小活性部分は必須であり、生理的条件下で細胞膜等の膜に結合性を有する、膜結合領域を含有することが好ましいが、実施例に示すように、細胞内領域は少なくとも全体は必須ではない。細胞外領域と膜結合領域との結合は直接でもよいし、リンカーペプチド等を介して間接的であってもよい。また、膜貫通領域は必ずしも天然のF a s L由来のものである必要はなく、場合によっては、ポリペプチド以外の膜結合性物質でもよいし、他の機能、例えば、多量体化能を有する物質を結合してもよい。なお、結合する膜としては細胞膜以外にリボソーム等が挙げられる。

本発明の第1の態様である新規F a s リガンド誘導体の具体例としては、配列番号1に記載の配列、又はその8～69番目のアミノ酸を欠失した配列（以下D4と称す）、および配列番号2に記載の配列、又はその8～69番目のアミノ酸を欠失した配列（以下D5と称す）に記載のアミノ酸配列からなるものである。配列番号1またはD4は天然型のヒトF a s リガンドのN末端から111～133番の23アミノ酸が欠失したものであり、配列番号2又はD5は天然型のヒトF a s リガンドのN末端から128～131番の4アミノ酸が欠失したものである。これらは膜結合型F a s リガンドを129番のL y sと130番のG l nの間で切断して可溶型F a s リガンドを放出するメタロプロテアーゼの作用箇所近

傍のアミノ酸が欠失している。上記の膜結合型F a sリガンド誘導体は欠失変異を有するが、その細胞障害活性は天然型の膜結合型F a sリガンドと同等以上である。

このため、本発明のF a sリガンド誘導体は、天然型の膜結合型F a sリガンドより、効率的に標的細胞表面のF a sに作用し、アポトーシスによる優れた細胞障害活性を示すことができる。メタロプロテアーゼによる分解を受けないので、膜から遊離せず、細胞障害活性が減少しないからである。

【0011】

なお、配列番号1または2に示したアミノ酸配列には、それぞれ4ヶ所の糖鎖付加可能部位（N-グリコシレーションサイト）があり、配列番号1においては、アミノ酸番号76～78、161～163、227～229、237～239が、配列番号2においては、アミノ酸番号76～78、180～182、246～248、256～258が糖鎖付加可能部位に相当する。本発明の新規F a sリガンド誘導体はこの位置に糖鎖が付加していてもよい。

本発明のF a sリガンド誘導体が、遺伝子工学的に酵母や動物細胞等の真核細胞を宿主として生産されたものである場合は、糖鎖が付加される場合があり、これに対し、本発明の膜結合型F a sリガンド誘導体が、大腸菌等の原核細胞を宿主として遺伝子工学的にポリペプチドを生産されたものである場合には、糖鎖の付加はない。

【0012】

本発明のF a sリガンド誘導体は、アポトーシスを誘導し、生体にとって不要な細胞を除去するために使用することが可能である。たとえば、エイズウイルス感染細胞ではF a s抗原が発現されているので、本発明のF a sリガンド誘導体は、エイズウイルス感染初期に使用してアポトーシスを人工的に誘導し、感染細胞を早期に除去する事により、エイズ治療に用いることができる。また、本発明のF a sリガンド誘導体は、ある種の自己免疫疾患に対しても、人為的にF a s抗原を介したアポトーシスを生じさせる事により、自己抗原反応性のT細胞を除去することができる。また、本発明のF a sリガンド誘導体は、癌治療するために使用することができる。なお、モリモト H. (Morimoto H.)等は、癌細胞にFa

s 抗原を介したアポトーシスを誘導する事によって、アドリアマイシンやシスプラチンによる制癌効果が相乗的に増強されることを報告している (Cancer Res., 53 巻、2591-2596 頁、1993年)。

【0013】

本発明の第2の態様である可溶型 Fas リガンドは、天然型の Fas リガンドの少なくとも1部を有し、界面活性剤等を用いなくても水溶液に可溶性であるもののうち、Fas アンタゴニストとして機能するもの、またはアポトーシス調節作用を有するものであれば特に制限されない。本発明において、Fas アンタゴニストとは、Fas / Fas リガンド系アンタゴニストというべきものであり、Fas によるシグナルの発生又は伝達をいずれかの段階で何らかの形で遮断し、Fas を介するアポトーシスを抑制又は阻害するものである。

本発明の可溶型 Fas リガンドは、天然型の Fas リガンドの少なくとも1部を有し、界面活性剤等を用いなくても水溶液に可溶性であるもののうち、例えば、Fas 細胞外領域と相互作用し、天然型の Fas L と競合したり、または、Fas のダウンレギュレーションを引き起こすものが挙げられる。このような可溶型 Fas リガンドとしては、Fas リガンドの細胞外領域の少なくとも一部からなるものが例示され、好ましくはヒト天然型 Fas リガンドのN末端から130番目のGlnからC末端までのアミノ酸配列からなるペプチドが例示される。

【0014】

さらに、天然の膜結合型 Fas リガンド、および天然の膜結合型 Fas リガンドと同様に生体内または試験管内でメタロプロテアーゼにより切断されて可溶性 Fas リガンドになるポリペプチドは、本発明の可溶型 Fas リガンドの前駆体として用いられる。

【0015】

本発明者は可溶型 Fas リガンドが Fas L、特に膜結合型の Fas L 誘導細胞障害を抑制すること、すなわち、Fas アンタゴニストまたはアポトーシス調節物質として作用し、アポトーシスを抑制、阻害または調節することを見出し本発明を完成させた。このような本発明の Fas アンタゴニストとして機能する可溶型 Fas リガンドを用いることにより、Fas L 誘導アポトーシスの治療、予

防を行なうことができる。また、可溶型 Fas Lを用いる Fas 機能またはアポトーシスの抑制若しくは調節方法、および可溶型 Fas Lを含有するアポトーシス拮抗剤若しくは調節剤が提供される。

【0016】

肝炎、インシュリン依存性糖尿病、および甲状腺炎（橋本病）のようなCTL介在自己免疫疾患において Fas L誘導アポトーシスが関与することが示されてきた。さらに、アポトーシスが関与する疾患としては、例えば、免疫担当細胞あるいは肝細胞のアポトーシスにより組織の機能が著しく低下した結果生じると考えられる、エイズウイルス感染後期の免疫能の低下や、劇症肝炎における肝機能低下が挙げられる。また、アポトーシスが関与する疾患として、心疾患、GVHD、腎疾患、虚血再灌流障害に基づく疾患及び臓器障害に基づく疾患が挙げられる。

例えば、心疾患としては、特に心筋梗塞等の虚血性心疾患、種々の原因による心筋炎、心筋症、特に拡張型心筋症、心不全、並びに虚血再灌流障害及びそれに基づく心疾患等が；GVHDとしては、不適合性骨髄移植や先天性免疫不全症への骨髄移植等の骨髄移植後に起るGVHD、臓器移植後に起るGVHD、免疫低下した宿主に対する大量輸血等の輸血後に起るGVHD等が；虚血再灌流障害としては、肝臓、心臓、腎臓、肺、脾臓、小腸、大腸、胃、膵臓、脳、筋肉、皮膚などにおいて認められる虚血再灌流障害及びそれに基づく疾患、例えば、肝不全、再灌流不整脈、腎不全、壊死性腸炎などで各臓器の損傷や機能障害が挙げられる。

さらに、アポトーシスが関与する疾患として、上述した虚血再灌流障害に基づく疾患、アレルギー性接触皮膚炎または関節リウマチなどが、さらには、SIRSに伴うMODS挙げられる。

【0017】

また、アポトーシスが関与する疾患として、エンドトキシンによる臓器障害、特に肝臓障害又はエンドトキシン血症もしくは敗血症において、急性期のみならず、慢性的な障害が挙げられる。

さらに、アポトーシスが関与する疾患として、肝臓においては、移植などの外

科的手術時、あるいはショックおよび循環不全などによる肝血流量（血液供給）の減少、あるいは遮断の際の虚血再灌流障害において、肝不全や組織障害ならびに肝機能低下が挙げられる。心臓においては、心筋梗塞に対する血栓溶解療法、経皮的冠動脈内血栓溶解療法（P T C R）や経皮的冠動脈内腔拡張術（P T C A）後の再灌流の結果、細胞内カルシウムイオンの過負荷等に起因する不可逆的な細胞死や致死的な不整脈が挙げられる。また、腎臓においては、術後、または腎移植等に起因する虚血再灌流による腎不全や糸球体固有細胞（内皮細胞、上皮細胞、メサングウム細胞）、メサングウム基質、基底膜の細胞外基質または尿細管上皮細胞などの障害が挙げられる。

【0018】

本発明の第1および第2の態様の、可溶型F a s リガンドおよびF a s リガンド誘導体は医薬組成物に用いることができる。この場合は、少なくとも一種の医薬用担体、または媒体、例えば滅菌水や生理食塩水、植物油、鉱油、高級アルコール、高級脂肪酸、無害性有機溶媒等、さらには必要に応じて賦形剤、着色剤、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、溶解補助剤、吸着防止剤、安定化剤、保存剤、保湿剤、酸化防止剤、緩衝剤、等張化剤、無痛化剤等と適宜組み合わせることで注射剤や経口剤などの医薬組成物やキットの形態をとることができる。本発明の予防・治療剤は、好ましくは非経口的に、たとえば、静脈内注射、冠動脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等により全身あるいは局部的に、ならびに急速もしくは持続的に投与することができる。本発明の予防・治療剤のヒトに対する投与量は患者の病態、年齢あるいは投与方法により異なるが、適宜適当な量を選択することが必要である。例えば、全身投与の場合、約0.1-100mg/kgの範囲で適当な分割容量を選択することができる。しかしながら、当該医薬組成物の使用はこれらの投与方法および投与量に制限されるものではない。さらに、他の薬剤と併用してもよい。

本発明の第1および第2の態様のF a s リガンドを医薬組成物に用いる場合は、常法に従って、製剤化することができる。たとえば、注射用製剤は、精製された本発明の第1および第2の態様のF a s リガンドを溶剤、たとえば、生理食塩水、緩衝液などに溶解し、それに、必要に応じて吸着防止剤などを加えたものであり

、または、使用前に溶解再構成するために凍結乾燥したものであってもよく、凍結乾燥のための一般的な賦形剤を使用することができる。

【0019】

本発明の第1および第2の態様のF a s リガンドはいかなる方法で生産されたものであってもよい。例えば、ペプチド合成機（例えば、ペプチドシンセサイザー430A型、パーキンエルマージャパン（株）製）を使用して化学合成してもよい。

また、ヒトおよびヒト以外のいかなる生物の組織や細胞、体液から精製してもよい。ヒトや動物の体液としては、血液や尿が挙げられる。細胞としては、本発明の新規ポリペプチドを産生する細胞を適宜選択して用いることができる。例えば、脾細胞や胸腺細胞、リンパ球系細胞、および、それらの株化細胞などを、ノーザンブロットあるいはウエスタンブロット等で解析し、本発明の新規ポリペプチドの発現量の高いものを選択する。

必要があれば、細胞をPMA（ホルボールミリスレートアセテート）やイオノマイシン、PHA（フィトヘムアグルチニン）、ConA（コンカナバリンA）、IL-2（インターロイキン-2）等の刺激剤から選ばれる、1種もしくは2種以上の適切な刺激剤で刺激して産生誘導し、細胞もしくは培養上清から、当該ポリペプチドを精製してもよい。精製は、濃縮や、各種クロマトグラフィー、塩析など一般的に行われているポリペプチドの精製方法を適宜組み合わせ、F a s 抗原への結合性、もしくは、F a s 抗原を発現している細胞への細胞障害活性等を指標として行うことができる。

しかし、本発明の第1および第2の態様のF a s リガンドは、その純度の面から、遺伝子工学的に生産されたもの、すなわち、組換え型ポリペプチドであることが好ましい。当該ポリペプチドを遺伝子工学的に生産するには、適当なベクターに本発明の第1および第2の態様のF a s リガンドのcDNAや本発明のDNA等を組み込み組換え遺伝子を得て、該組換え遺伝子で適当な宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養して培養混合物を回収し、当該ポリペプチドを精製する。また、該DNAや組換えDNA分子を利用して無細胞系の合成方法（サンプブルック J. (Sambrook, J.) et al.: Molecular Cloning, a Laboratory Ma

nual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989 年)) で得る方法も例示される。

【0020】

本発明の第3の態様の新規DNAは、本発明の新規Fasリガンド誘導体、特に配列番号1および2に記載されたアミノ酸配列、またはD4、D5をコードするものである。本発明のDNAは、それが本発明の新規Fasリガンド誘導体をコードする限り、いかなる配列からなるDNAであってもよい。同じアミノ酸をコードするDNAのトリプレットは、アミノ酸の種類ごとに1～6種類迄存在することが知られており、同じペプチドをコードする塩基配列は1種類には限定されないが、このうちいずれのコドンを使用してもよい。

【0021】

また、本発明のDNAは、それが本発明の新規Fasリガンド誘導体をコードする塩基配列を含有する限り、cDNAであってもイントロンを有する染色体DNAであってもよい。しかしながら、ベクターへの導入の容易さ等、遺伝子工学的手法における扱い易さから、本発明の新規DNAはcDNAであることが好ましく、配列番号4、5および6に記載された塩基配列を有するものが例示される。

【0022】

本発明の新規DNAは、1本鎖であっても、それに相補的な配列を有するDNAやRNAと結合して2重鎖、3重鎖を形成していても良い。

また、本発明のDNAの塩基配列が提供されることにより、RNAの配列、相補的なDNAおよびRNAの配列が一義的に決定される。

【0023】

本発明のDNAは、本発明の新規Fasリガンド誘導体を組み換えDNA技術を使用して製造するために用いることができる。すなわち、本発明のDNAを、プロモーター配列等の発現に必要な配列を有する適当な発現ベクターの適当な位置に挿入し、このベクターで適当な宿主細胞を形質転換することによって、形質転換体に本発明の新規Fasリガンド誘導体を発現させることができる。また、本発明の新規DNAを適当なベクターに組み込んで、投与し、例えば、ガン、ウ

ウイルス疾患、自己免疫疾患等の遺伝的にアポトーシスの機構が欠損している疾患等の遺伝子治療にも使用する事ができる。さらに細胞株や生体外に取り出した細胞を本発明のDNAにより形質転換し、それを生体に戻すことにより細胞治療を行なうこともできる。また、FasL誘導体を発現する移植用の臓器や組織を提供するためのトランスジェニック動物の作製に使用できる。

さらに、本発明の新規DNAは、アンチセンス医薬の開発に使用したり、トランスジェニックマウス等、アポトーシスが関与する疾患のモデル動物の作製に使用したり、酵素等で標識して、組織におけるFasリガンドおよびその誘導体の発現状況を検査し、アポトーシスが関与する疾患の診断に使用することができる。

【0024】

本発明の新規DNAは化学合成やDNAライブラリーから得ることができる。

本発明の新規DNAを化学合成するには、たとえば、次のように行えばよい。すなわち、所望の塩基配列を有するDNAを約20塩基程度からなる断片に分けてDNA化学合成機（例えば、394型、パーキンエルマージャパン（株）製）を用いて合成し、その後、必要に応じて5'末端のリン酸化を行い、各断片をアニーリングし、ライゲーションして目的とするDNAを得る。

本発明の新規DNAをDNAライブラリーから得る例としては、適当なゲノムDNAライブラリーやcDNAライブラリーを、ハイブリダイゼーションによるスクリーニング法や、抗体を用いたイムノスクリーニング法等でスクリーニングし、目的のDNAを有するクローンを増殖させ、そこから制限酵素等を用いて切り出す方法がある。

本発明の新規DNAはまた、ゲノムDNAライブラリーもしくはcDNAライブラリーを鋳型とするPCR (Polymerase Chain Reaction)によっても得る事ができる。

【0025】

【実施例】

以下に記載の条件に従って、本発明の1例を実施した。

(1) ヒト可溶性FasLの生産と精製

ハムスター抗ヒトFasLモノクローナル抗体 (clone 4H9) はタナカ等、Nature Med.2,317-322,1996に記載されている。3. 5 ml のリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) 中の抗体 (10. 5 mg) が5 ml のプロテインA-セファロース4FFビーズ (ファルマシア社製) と混ぜられ、4℃で1時間保温した。ビーズは念入りにトリス緩衝化生理食塩水 (TBS, 50 mM Tris-HCl, pH 7. 4, 150 mM NaCl) で洗浄し、200 mM のほう酸ナトリウム緩衝液 (pH 9. 0) で1度洗浄し、結合していないタンパク質を取り除いた。結合抗体は200 mM ほう酸ナトリウム緩衝液に溶かした20 mM ジメチルピメルイミデート (dimethyl pimemidate) (DMP) とインキュベートすることにより、ビーズに共有結合的に結合された。

【0026】

ヒトFasLを発現するマウスWR19L細胞形質転換体 (1A12細胞) はタナカ等、Nature Med.2,317-322,1996に記載された。1A12細胞 (1×10^5 細胞/ml) が5% FCSが補充されたRPMI 1640培地で3日間培養され、約2 Lの培地が集められた。培地中のタンパク質は硫酸沈殿 (50-70%) で集められ、PBSで透析された。タンパク質は、次いで、PBSで平衡化された抗FasL抗体結合プロテインAセファロースのカラム (1 ml) にかけられた。カラムは150 mM のNaClを含んだ50 mM Tris-HClバッファー、pH 8. 6の20 mlで洗浄され、カラムに吸着したFasLは150 mM のNaClを含む50 mM グリシン-HClバッファー (pH 2. 2) で溶出された。溶出液は直ぐに1 M Tris-HCl (pH 7. 5) で中和され、PBSに透析され、セントリコン (アミコン社製) を用いて濃縮された。

【0027】

N末端アミノ酸配列を決定するために、6 μ g の精製されたFasLが0. 1%のSDSが入っている10-20%のポリアクリルアミドゲル (第一純正化学社製) の電気泳動で分離された。タンパク質は、ブロッティング用のバッファーが0. 075% SDSを含んでいた以外はフクナガ等、J.Biol.Chem.,265,14008-14015,1990に記載のとおりPVDF膜に30 Vで16時間、電気ブロッティングされた。膜上のタンパク質はクマジーブリリアントブルーで染色することによ

り検出され、宝酒造株式会社に依頼してN末端のアミノ酸配列がエドマン分解で決定された。

【0028】

(2) 様々なヒト Fas L の変異体を発現する形質転換体の確立

細胞内領域(8-69番のアミノ酸)が欠けたヒト Fas L の発現プラスミド(pBOSHFLD1)がタナカ等、Nature Med.2,317-322,1996に記載された。鋳型としてpBOSHFLD1を用いた組み換えPCRにより、切断部位に一連の欠失と点変異を有するヒト Fas L 変異体用の発現プラスミド(pBOSHFLD4, pBOSHFLD5, およびpBOSHFLD6)が、作られた。要約すると、111-133番のアミノ酸が欠失しているpBOSHFLD4を構築するために、Fas L cDNAの5'部分がpEF-BOSベクターのセンスプライマー(BOS6; CCTCAGACAGTGGTTCAAAG)(ミズシマ、ナガタ、Nucleic Acids Res.,18,5322,1990)と、アンチセンス欠失プライマー(DA4; TTTTCAGGGGGTGGACTGGGCTCCTTCTGTAGGTGGAAG、ヒト Fas L の105-110番と134-139番のアミノ酸をコードする配列)により増幅された。cDNAの3'部分はDA4プライマーに相補的なセンスプライマー(DS4)と、Fas L cDNAの3'非コード領域の配列を有するプライマー(HFLP3; GCTCTAGAACA TTCTCGGTGCCTGTAAC)で増幅された。PCRの条件はタカハシ等、Cell,76,969-976,1994に記載されたとおりである。最初のPCR産物はアガロースゲル電気泳動で精製され、1:1で混合され、次いでプライマーBOS6とHFLP3で第2回目のPCRで増幅された。得られたDNA断片はXbaIで消化され、pEF-BOSベクターに挿入された。他の欠失や点変異は以下のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて同様な手法で作成された。つまり、pBOSHFLD5(128-131番のアミノ酸の欠失)に対しては、DA5(TGGACTGGGGTGGCCCAAAGATGATGCTGT)とDS5プライマー(DA5に相補的)、pBOSHFLD6(Lys-129をAlaに置換)に対しては、DA6(GGGGTGGCCTATTTGTGCCTCCAAAGATGATGC)とDS6プライマー(DA6に相補的)である。

マウスWR19L細胞はpPURと一緒にピューロマイシン耐性遺伝子（クローンテック社製）を有する発現プラスミドを、エレクトロポレーションでコトランスフェクションされた（イトウ等、Cell,66,233-243,1991）。ピューロマイシン耐性形質転換体は800ng/mlピューロマイシンで選択され、ヒトFasLを発現する形質転換体のクローンはフローサイトメトリー用のビオチン化された抗ヒトFasL抗体（4H9）およびPE標識ストレプトアビジン（ベクトンディキンソン社製）を用いたFACS分析により選択された。

【0029】

（3）細胞障害活性の分析

Fas発現W4細胞やジャーカット細胞に対するヒト可溶性FasLの細胞障害活性はタナカ等、EMBO J.,14,1129-1135,1995に記載のとおりMTT法により決定された。これに対し、Fas発現W4細胞やジャーカット細胞に対するFasL発現形質転換体の細胞障害活性は基本的にはスダ等、Cell,75,1169-1178,1993に記載されたとおり ^{51}Cr -放出分析で決定された。要約すると、W4やジャーカット細胞（ 1×10^4 ）は ^{51}Cr でラベルされ、様々な比でFasL形質転換体と混合された。37℃で4時間のインキュベーションの後、標的細胞からの ^{51}Cr の特異的な放出が測定された。

【0030】

初代肝細胞に対する可溶性FasLやFasL形質転換体の細胞障害活性は以下のように測定された。マウス肝細胞は11週齢の雌のC3H/Heのマウス（SLC，静岡から購入）から、アダチ等、Nature Genet.11,294-300,1995に記載のとおり調製された。肝細胞（ 1×10^5 ）は0.03% I型コラーゲンでコートされた48穴のプレートに植えられ、5% FCSを含むDMEMで24時間培養された。肝細胞は、可溶性FasLやFasL形質転換体と一緒に37℃で22時間インキュベートされた。培地に放出されたGOTの濃度は和光化学社製のトランスアミナーゼCIIキットで測定された。

【0031】

（4）免疫沈降とウェスタンブロッティング

FasL形質転換体は10% FCSを含むPRMI 1640培地で培養され、

培地中の Fas L と細胞溶解物が免疫沈降に続くウエスタンブロッティングで分析された。要約すると、細胞は、1%NP40、1mM [p-アミノフェニル]メタンスルホニルフルオリドハイドロクロライド、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のペプスタチン、および $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のロイペプチンを含む TBS 中で氷上で30分インキュベーションすることより溶解した。15,000rpmで20分間遠心した後、免疫沈降の為に上清が集められた。 4×10^5 細胞の細胞溶解物 ($100\mu\text{l}$) や $100\mu\text{l}$ の培地が4℃で45分間 $25\mu\text{l}$ のプロテインAセファロース4FFビーズ (ファルマシア社製) に前もって吸収され、次いで、 $10\mu\text{l}$ の抗 Fas Lモノクローナル抗体 (4H9) で修飾されたプロテインAセファロースと4℃で一晩インキュベーションされた。ビーズは0.1%NP40を含むTBSで念入りに洗浄され、 β メルカプトエタノールを含まない $10\mu\text{l}$ のレミールサンプルバッファ (Laemmli's sample buffer) と懸濁された。サンプルは10-20%勾配ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、タンパク質は4℃、30Vで、15時間でPVDF膜 (ミリポア社製) に転写された。Fas Lタンパク質はタナカ等、EMBO J.,14,1129-1135,1995に記載のとおり、抗 Fas Lポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングで検出された。

【0032】

実施例で得られた結果は、以下のように表1、および図1～7に表された。

表1には、野生型と変異 Fas Lを発現する形質転換体によるヒト Fas Lの可溶性の生産の結果が示された。

【0033】

表 1

構成	クローン	細胞障害活性(units/ml)
野生型	1 A 1 2	1 6 6 7
	1 F 1 0	5 5 6
D 4	4 1 B	< 2 0
	4 4 D	< 2 0
D 5	5 9 A	3 3
	5 - 2 - 2 1	6 7
D 6	6 1 B	4 0 0
	6 1 7 C	3 3 3

【0034】

野生型、欠失変異体 (D 4, D 5)、または点変異 (D 6) を発現するマウス WR 1 9 L 細胞形質転換体クローンは $20 \mu\text{M}$ の BB 2 1 1 6 の存在下で 37°C で 24 時間培養され、次いで 4×10^5 細胞/ml 濃度で BB 2 1 1 6 なしで、 37°C で 24 時間培養した。上清の細胞障害活性は W 4 細胞をターゲット細胞として用いて MTT 分析を行なうことにより測定された。細胞障害活性の 1 ユニツトは $100 \mu\text{l}$ 中の 7.5×10^4 細胞に対して極大の 2 分の 1 の細胞障害活性を付与する希釈率として定義された。

【0035】

図 1 には、精製されたヒト可溶性 Fas リガンドが示された。

(A) は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析の結果である。精製された可溶性ヒト Fas L ($6 \mu\text{g}$) が 0.1% SDS の存在下 10-20% 勾配ポリアクリルアミドゲルで電気泳動により分析され、クマジーブリリアントブルーで染色された。サイズマーカーとして、分子量スタンダード (アマーシヤム社、レインボウTM 着色タンパク質マーカー) が並行して流され (M)、標準

タンパク質のサイズがキロダルトン (kD) で示された。(B) は可溶型 F a s L の細胞障害活性を示したものである。7. 5×10^4 マウス W4 やヒトジャーマン細胞が、96穴マイクロタイタープレート中で提示した濃度の可溶型 F a s L と 37℃ で 15 時間インキュベーションされた。細胞生存率は MTT 分析を用いて測定され、F a s L なしで観察された生存率に対するパーセンテージとして表された。

【0036】

図2には欠失や点変異を有する F a s L 構築の該要図が示された。

野生型ヒト F a s L (w i l d)、欠失 (D4 および D5)、および点変異 (D6) の構造が概略的に示された。C Y T, T M および E X T は、それぞれヒト F a s L の細胞内、膜貫通、および細胞外領域をあらわす。ヒト F a s L の切断部位のアミノ酸配列 (E K Q I) が示された。D4 と D5 の構築では、それぞれ、111-133番と 128-131番のアミノ酸配列が欠失させられ、D6 の構築では、L y s 129 が A l a に置換された。

【0037】

図3には、ヒト F a s L 欠失変異による可溶型の F a s L の非放出が示された。

形質転換体におけるヒト F a s L の免疫的検出が示された。親株である W R 19 L 細胞 (W R 19 L) や、野生型のヒト F a s L (w i l d) や D4、D5 や D6 変異体を発現する形質転換体が 20 μ M の B B 2116 を含有する培地で 4×10^5 細胞/ml の濃度で 24 時間培養された。細胞は次いで B B 2116 のはいていない培地に移され、さらに 24 時間インキュベートされた。形質転換体の細胞溶解物 (C) と上清 (S) は抗ヒト F a s L モノクローナル抗体 (4 H 9) と免疫沈降に供された。免疫沈降物は上記のとおり、ウサギ抗ヒト F a s L 抗体を用いてウェスタンブロッティングで分析された。サイズマーカーとして分子量スタンダード (アマーシャム社製、レインボーマーカー) が並行して電気泳動され、標準タンパク質のサイズはキロダルトン (K D) で示された。

【0038】

図4は細胞表面上での F a s L の発現を示す。野生型 F a s L (クローン 1 A

12と1F10)、D4変異体(クローン41B、44D)、D5変異体(クローン59Aと5-2-21)、またはD6変異体(クローン61Bおよび617C)を発現するマウスWR19L細胞形質転換体が20 μ MBB2116あり(破線)となし(実線)の培地で24時間培養された。細胞はビオチン化された4H9抗ヒトFasL抗体とPE標識ストレプトアビジンで染色され、上記のとおり提示したフローサイトメトリーで分析された。

【0039】

図5は膜結合型FasLのFasを過剰に発現するマウスW4細胞の殺傷力を示す。

親のWR19L細胞(白丸)と、野生型(クローン1F10、黒丸)、D4変異体(クローン44D、白四角)を発現する細胞形質転換体の細胞障害活性が⁵¹Crで標識したW4をターゲットとして用いて、上記のとおり提示したエフェクター/ターゲット(E/T)比で測定された。

【0040】

図6はヒトジャーカット細胞に対する膜結合型FasLの増大された細胞障害活性を示す。親のマウスWR19L細胞(WR19L)と、野生型(クローン1F10)、またはD4変異体(クローン44D)を発現するその形質転換体が20 μ MBB2116あり(黒丸)となし(白丸)で24時間培養された。細胞障害活性が⁵¹Crで標識したヒトジャーカット細胞をターゲットとして用いて、上記のとおり、提示したE/T比で測定された。

【0041】

図7はマウス肝細胞の可溶型と膜結合型のFasLの反応性を示す。(A)には肝細胞に対する可溶型FasLの細胞障害活性が示された。初代マウス肝細胞は10 μ g/mlのシクロヘキシミドがあり(黒丸)となし(白丸)でヒト可溶型FasLの提示した濃度で37℃で22時間インキュベーションされた。インキュベーションの後、キットを用いて上清のGOT濃度が測定された。合計のGOT活性は0.1%NP-40で細胞を溶解させた後で、細胞の溶解物中で測定された。特異的障害は合計のGOT活性に対する放出されたGOT濃度のパーセンテージとして表された。(B)にはマウス肝細胞に対する膜結合型FasLの

細胞障害活性が示された。マウス肝細胞は、WR19L細胞（白丸）、またはD4変異体（クローンD44、白四角）と、提示したE/T比で、37℃で22時間インキュベーションされた。インキュベーションの後、障害活性は上記のとおり測定された。（C）は可溶型FasLによる膜結合型FasLの細胞障害活性の阻害を示した。マウス肝細胞がE/T比2.0で、可溶型FasLが提示した濃度で存在して、D4変異体を発現するWR19L細胞形質転換体と一緒に37℃で22時間インキュベートされた。インキュベートの後、特異的障害活性が上記のとおり測定された。

【0042】

＜ヒト可溶型Fasリガンドの精製＞

本発明者は以前、構成的にヒトFasLを発現する安定な形質転換体（1A12 Cell）を確立した。形質転換体は細胞表面にFasLを発現して、また培地中にも機能を持った可溶型FasLを生産した（タナカ等、Nature Med.2, 317-322,1996）。可溶型ヒトFasLを精製するために、1A12細胞は5%のFCSを含むPRMI培地で培養され、FasLは抗FasL抗体（4H9）を固定したプロテインAセファロースで親和的に精製された。およそ200μgの精製されたFasLがコンディションドメディウム2000mlから得られた。図1aに提示したとおり、精製したFasLのポリアクリルアミドゲル電気泳動は分子量26,000に単一バンドを示し、これは活性化されたヒト末梢血リンパ球により生産される可溶型FasLに似ていた（タナカ等、EMBO J.,14,1129-1135,1995）。精製したFasLの細胞障害活性がFas発現マウスW4細胞をターゲットとして分析された時、それは 2×10^7 U/mgの比活性を有し、これは基本的にPichia Pastorisにより生産された組み換え可溶型FasLと同じであった（タナカ等、J.Immunol.,158,2303-2309,1997）。ヒトジャーカット細胞は内因性Fasを発現し、抗Fas抗体誘導アポトーシスに感受性がある（タカハシ等、Eur.J.Immunol.,23,1935-1941,1993）。可溶型FasLの細胞障害活性がジャーカット細胞を標的として分析されたとき、非常に弱い活性を示した。すなわち、可溶型FasLの1μg/mlが15時間でたった30%の細胞しか殺すことができず、ジャーカット細胞が、同じ条件で、可溶型

F a s Lに対し、マウスW4細胞より1000倍以上非感受性であることを示す。

【0043】

<F a s Lの切断位置>

精製された可溶型F a s LのN末端のアミノ酸配列を決定するために該タンパク質はポリアクリルアミド上で電気泳動で分離され、P V D F膜に転写された。エドマン分解法による自動シーケンサーにおける精製された26kDaタンパク質の分析の結果、G l n-I l e-G l y-H i s-P r o-S e r-P r o-P r oの単一の配列が示された。この配列はヒトF a s Lの130~137番のアミノ酸に正確に対応した。これらの結果から本発明者は、膜結合型として合成されたヒトF a s LはL y s-129とG l n-130の間で切断されて可溶型になると結論づけた。

【0044】

<切断されないF a s Lを発現する細胞株の確立>

切断されないF a s Lを発現する形質転換体を確立するために、切断部位に欠失や点変異がある一連の発現プラスミドを構築した。D4やD5は、それぞれ、-19~+4と-2~+2のアミノ酸が欠失した欠失変異である。D6はL y s 129をA l aに置き換えた点変異を持っている。これらの変異した遺伝子はヒトエロンゲーションファクター（p E F）1 α 遺伝子のプロモーターの制御下におかれ、マウスWR19L細胞へ導入された。

【0045】

変異F a s Lが切断されるか否かを調べるために、それぞれの形質転換体は、メタロプロテアーゼ阻害剤B B 2 1 1 6を含有する培地中で24時間培養され、次いで、阻害剤がはいっていない培地へ移された。それらを24時間培養した後、培養上清中のF a s L活性とF a s Lタンパク質が分析された。表1に示すとおり、本来の切断部位を持つF a s Lの形質転換体は高濃度で培地中に可溶型F a s Lを分泌した。切断部位における23アミノ酸欠失変異遺伝子形質転換体（C D 4）は全くF a s L活性を示さず、4アミノ酸欠失変異形質転換体（C D 5）も、ほとんど、細胞障害活性を生じなかった。一方、-1でのL y sからA l

aへの点変異は依然F a s Lの可溶型を生じた。形質転換体の培養上清と細胞破砕物は、次いで、抗ヒトF a s Lモノクローナル抗体（4 H 9）で免疫沈降され、免疫沈降は抗ヒトF a s Lポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングで分析された。図2 Bで示すとおり、それぞれのF a s L形質転換体から得られた細胞破砕物は32～35 k D aの主要バンドを示し、それは欠失のサイズから予想されるものであった。野生型と点変異（D 6）の上清は分子量26000の可溶型F a s Lを含むが、一方、可溶型F a s Lタンパク質は欠失変異を発現する形質転換体（C D 4とC D 5）の上清中では見られなかった。これらの結果は野生型とD 6変異の上清中ではF a s L活性が検出され、D 4とD 5では検出されなかったことと一致する。

【0046】

タンパク質切断に対する変異F a s Lの耐性を確かめるために、細胞表面でのF a s L発現をフローサイトメトリーで調べた。図4で示すとおり、B B 2 1 1 6の存在下で培養した場合、全ての形質転換体が細胞表面に高濃度のF a s Lを発現した。野生株や置換変異体を発現する形質転換体をB B 2 1 1 6なしで培養した場合、細胞表面でのF a s Lの発現濃度は著しく減少した（約10分の1）。一方、欠失変異の形質転換体（C D 4およびC D 5）は同じ条件下で細胞表面からほとんどF a s Lを失わなかった。これらの結果はF a s Lの細胞外領域の切断部位のE K Q Iの配列は膜結合型F a s Lの開裂に不可欠であることを示した。一方、-1位での単一置換変異は効果がないことは、-1位のアミノ酸（L y s）は開裂に重要ではないことを示唆した。

【0047】

<膜結合型F a s Lの増大された細胞障害活性>

本発明者は次いで、可溶型F a s Lを生じない膜結合型F a s Lが機能を有するか否かを調べた。図5に示すとおり、開裂可能または開裂不可能F a s L（w tまたはD 4変異体）を発現する形質転換体はW 4細胞に対して同程度の細胞障害活性を示し、膜結合型F a s Lは活性があり、切断部位での23アミノ酸の欠失はF a s LがF a sに結合してアポトーシスを誘導する能力に影響しないことを示した。

【0048】

次いで、標的としてジャーカット細胞を用いて、これらの形質転換体の細胞障害活性が調べられた。図6に示すとおり、非変異のF a s Lを発現する形質転換体がエフェクターとして用いられた場合、細胞障害活性は非常に低かった。一方、開裂できないF a s Lを発現するD4形質転換体がエフェクターとして用いられた場合、それらは効率的にジャーカット細胞を殺傷した。ジャーカット細胞の膜結合型F a s Lへの反応性はW4細胞に匹敵するか僅かに劣る。つまり、約50%のW4細胞がE/T比5.0で特異的に殺傷されるのに対し、20%以上のジャーカット細胞がE/T比3.0で殺傷される。これらの結果は、少なくともヒトジャーカット細胞に対して、膜結合型F a s Lが可溶型F a s Lより潜在的な細胞障害性が高いことを示した。従って、非変異のF a s Lを発現する形質転換体がBB2116で前処理された場合、その細胞は開裂できないD4変異体で観察されたのと同様な、ジャーカット細胞に対する強い細胞障害活性を示した（図6）。

【0049】

膜結合型F a s Lの細胞障害活性が可溶性F a s Lのそれより強いことを確認するために、さらに本発明者はマウス初代培養肝細胞を標的として用いた。マウス肝細胞はF a s 受容体を発現し、シクロヘキシミドの存在下で、アゴニスティックな抗F a s 抗体、J o 2により殺される（ニ一等、Exp.Cell Res.,215,332-337,1994）。可溶性F a s Lが細胞障害のエフェクターとして用いられた場合、同様な結果が得られた。つまり、可溶性F a s Lは肝細胞に対してほとんど細胞障害活性を示さないが、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のシクロヘキシミドがあれば細胞死がおこる（図7A）。一方、開裂することができない欠失変異F a s L（D4）を発現する形質転換体をエフェクターとして用いると、シクロヘキシミドなしで効果的に肝細胞を殺す（図7B）。同様に、開裂できるF a s L（wt）を発現する形質転換体は弱い細胞障害活性を肝細胞に対して示すけれども、その細胞障害活性はそのエフェクター細胞をBB2116で前処理することにより、大幅に増大する（データは省略する）。

【0050】

＜可溶型FasLの阻害効果＞

上述したとおり、非変異のFasLの形質転換体は膜結合型のFasLを高濃度で発現する（図3）が、その細胞障害活性は低い（図6）。これらの結果は形質転換体により産生された可溶型FasLが細胞障害活性に対して阻害的に働くことを示唆した。この可能性を調べるために、肝細胞が様々な濃度の可溶型FasLで前処理され、肝細胞のFasLの膜結合型（D4変異体）に対する反応性が調べられた。図7Cに示すとおり、可溶型FasLは用量依存的に細胞障害活性を阻害し、 $0.4\mu\text{g/ml}$ の可溶型FasLはE/T比2.0で細胞障害活性の半分を阻害するのに十分であった。

【0051】

本発明において、ヒトFasLの可溶型はヒトFasL発現プラスミドにより形質転換されたマウスT細胞株で生産された。精製されたヒトFasLのN末端アミノ酸配列の決定は可溶型ヒトFasLがLys129とGln130の間で開裂して、放出されることを明らかにした。FasLの切断部位近傍のアミノ酸配列（Glu-Lys-Gln-Ile）はヒト、ラット、およびマウスで観察され（タカハシ等、Int.Immunol.,6,1567-1574,1994）、そして切断部位近傍の4～23アミノ酸の欠失は可溶型ヒトFasLの上清中への放出を阻害した。この結果は、FasLを認識して分解するプロテアーゼにとって、切断部位近傍の該アミノ酸配列が重要であることを示唆する。

【0052】

II型の膜タンパク質として合成されるTNFファミリー構成員のなかで、TNF α とCD40リガンドは可溶型になることが示された（ペレ等、Cell,63,251-258,1990；ピエトラベール等、J.Biol.Chem.,271,5965-5967,1996）。TNF α とCD40リガンドの切断部位は、それぞれLeu-Ala-Gln-Ala/Val-Arg-Ser-Ser、およびAsn-Ser-Phe-Glu/Met-Gln-Lys-Glyである（アガーウォール等、J.Biol.Chem.,260,2345-2354,1985；グラフト等、Eur.J.Immunol.,25,1749-1754,1995）。これらの配列はFasL（Ser-Leu-Glu-Lys/Gln-Ile-Gly-His）と明白な類似性は示さず、TNF α 、FasL、およびCD40リ

ガンドは異なった基質特異性をもった別個のプロテアーゼにより分解されることを示す。これに対し、FasLとTNF α の放出はどちらもマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)阻害剤(BB2116)により阻害され(ジーリング等、Nature 370,555-557,1994; マックジーハム等、Nature,370,558-561,1994; モーラー等、Nature,370,218-220,1994; タナカ等、Nature Med.2,317-322,1996)、TNF α とFasLを開裂するプロテアーゼは似た活性部位を有することを示唆する。最近、TNF α を分解するプロテアーゼ(TACE, TNF α 変換酵素)が同定されA Disintegrin And Metalloproteaseドメインを有する膜タンパク質であるADAMファミリープロテアーゼの構成員であることが示された(ブラック等、Nature 385,729-733,1997; モス等、Nature,385,733-736,1997)。今まで、このファミリーの10以上が知られている(ハワード等、Biochem.J.,1996; ウォルフスバーグ等、Develop.Biol.,169,378-383,1995; ヤガミ等、Nature,377,652-6,1995)。あるものは精巣や筋肉で特異的に発現して、特異的な機能を有しているが、これに対し他のものはむしろいたるところで発現し、機能は不明である。FasLを切断するプロテアーゼもADAMファミリープロテアーゼの一員であるようだ。TNF α 切断部位近傍の配列を有する12アミノ酸ペプチドはTACEを特定し、それを精製するためにうまく用いられた(ブラック等、Nature 385,729-733,1997; モス等、Nature,385,733-736,1997)。この研究で明らかにされたヒトFasLの切断部位の情報により本発明者はFasLの開裂に関与するプロテアーゼを特定するのに用いるペプチド基質を設計できる。

【0053】

TNF α とCD40リガンドで示されたとおり(ペレ等、Cell,63,251-258,1990; ピエトラベール等、Eur.J.Immunol.,26,725-728,1996)、膜結合型FasLは機能を有しており、FasLはその機能を発揮するのに細胞内に入る必要はないことは確実である。FasLのFasへの結合はFADDやFLICEのようないくつかのシグナル要素とFas受容体を含むDISC(Death-Inducing Signaling Complex)の形成を誘導し、細胞を殺す。本発明者はある細胞は可溶型および膜結合型FasLに異なった反応性

を有することを見出した。過剰にFasを発現するマウスW4細胞は可溶性のFasLで効率的に殺されるが、適当な濃度の内因性Fasを発現するヒトジャーカット細胞やマウス初代培養肝細胞は可溶性FasLに耐性である。一方、ジャーカット細胞と肝細胞は効果的に膜結合型FasLで殺される。この現象はどのように説明できるであろうか。TNFがレセプターに結合した場合、そのTNF/TNFレセプター複合体は、インターナライズし、分解され、レセプターのダウンレギュレーションを引き起こす(ツジモト等、Pro.Natl.Acad.Sci.,82,7626-7630,1985;ワタナベ等、J.Biol.Chem.,263,10262-10266,1988)。同様なインターナライゼーションと分解がFasL/Fas系でも生じるのかもしれない。可溶性FasL/Fas複合体は容易にインターナライズするかもしれない。膜結合型FasLとFasのインターナライゼーションは遅延するようだ。最近、メデマ等(メデマ等、EMBO J.,16,2794-2804,1997)は、Fas誘導アポトーシスの最も早いシグナル伝達分子の1つであるFLICEは細胞質膜でDISC中のみで活性化されるに違いないと報告した。Fas受容体が可溶性FasLにより迅速にインターナライズされる場合、膜結合型FasLにより誘導されるDISCは長くとどまりFLICEを活性化するのに対して、可溶性FasLによるFLICEの活性化は非常に少ない。W4細胞はジャーカット細胞や肝細胞よりFasを数多く発現するため、弱いシグナルの合計は細胞を殺すのに十分である。さらに可溶性FasLがFas受容体の急速なダウンレギュレーションを起こしたら、膜結合型FasLの細胞障害活性を阻害するだろう。本発明者は、Fasが誘導するアポトーシスを協調して刺激する(膜結合性FasLとは)別の膜分子の存在の可能性を除外することはできないが、上記の説明は可能性のある説明であると考える。

【0054】

本発明者は、最近ヒトHBVのエンベロープ遺伝子を肝臓で発現するトランスジェニックマウスがエンベロープ類蛋白を認識するCTLクローンを少量(3×10^6 細胞)注射されたとき、マウスは肝炎を起こしてFas依存性態様で死んだことを示した(コンドウ等、Nature Med.,3,409-413,1997)。一方、同様の効果を示すには大量の組み換え可溶性FasLが必要であった(タナカ等、158,

2303-2309,1997)。これらの結果は膜結合型FasLこそがインビボで機能性FasLであるという上述の結果から説明される。同様の発見が、前にTNF α で報告された、つまり、可溶型TNFでなく膜結合型TNF α が細胞死を起こすTNFタイプII受容体を活性化し（ゲレル等、Cell,83,793-802,1995）、可溶型TNFでなく膜結合型TNF α がリーシュマニアに対する防御活性化に参与することが示された（シベックとウィリー、J.Exp.Med.,174,755-759,1991）。最近、サロルザノ等がメタロプロテアーゼ阻害剤（BB2116）がマウスにおけるConA誘導肝炎を起こし得ることが示された（サロルザノ等、J.Immunol.,158,414-419,1997）。ConA活性化T細胞からのTNFとFasLの放出の抑制はより多くの肝細胞の細胞死を起こし得る。

【0055】

本発明者は、可溶型FasLを発見したとき、Fas受容体は多くの組織で発現されるので可溶型FasLが全身性組織破壊を引き起こすと考えた（タナカ等、Nature Med.2,317-322,1996；タナカ等、EMBO J.,14,1129-1135,1995）。しかし可溶型でなく膜結合型FasLに細胞障害活性が見つかったのでFasL誘導細胞死は局所的な反応であることが示唆される。免疫系の監視では、細胞障害性リンパ球がウイルス感染細胞や癌細胞を認識し、活性化される。細胞表面で発現したFasLは標的細胞を局所的に殺し、放出によりダウンレギュレートされる。この機構が無関係な健康な細胞を殺さないことを保証する。血清中に可溶型のヒトFasLを保有するヒト疾患全てではなく、一部のみが肝炎と好中球減少症を示したことは（タナカ等、Nature Med.2,317-322,1996）、可溶型FasLそのものは普通の細胞に対して無毒である事と一致する。細胞が例えばFas発現の正の調節によりFas誘導アポトーシスに感作させれば、これら細胞は可溶型FasLで殺されるだろう。

【0056】

FasLは目や精巣で構成的に発現され、免疫回避に対するその役目が示唆される（ベルグロ等、Nature 377,630-632,1995；グリフィス等、Science,270,1189-1192,1995）。この現象を応用して、いくつかのグループは最近移植で免疫の攻撃から逃げるためにFasLを発現しようとした。ある報告では、FasL

を発現する筋芽細胞と共に移植したランゲルハンス β 細胞は長く生き残った（ロー等、*Science*,273,109-112,1996）が、一方、他の報告では、FasLを発現する β 細胞または腫瘍細胞は好中球を増やし、FasLを発現しない細胞より速やかに殺された（アリソン等、*Proc.Natl.Acad.Sci.*,94,3943-3947,1997；セイノ等、*Nature Medicine*,3,165-170,1997）。以前、クラブ等は可溶型TNFを生産する腫瘍細胞が炎症をおこすが、一方、膜結合型TNFを生産する細胞は炎症をおこさないことを報告した（クラブ等、*J.Immunol.*,149,2076-2081,1992）。これにより、移植片で膜結合型FasLだけを産生する様に設計されたF

a s Lを発現することは興味深いかもしれない。

【0057】

【発明の効果】

本発明により、F a s アンタゴニストとして機能する可溶性F a s リガンド、細胞障害活性に優れた新規な膜結合性F a s リガンド誘導体および該ペプチドをコードするDNAが提供され、F a s L 誘導アポトーシスが関与する疾患の、治療および予防等に寄与することができる。

【0058】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：258

配列の型：アミノ酸

配列の種類：タンパク質

配列：

Met	Gln	Gln	Pro	Phe	Asn	Tyr	Pro	Tyr	Pro	Gln	Ile	Tyr	Trp	Val
1				5					10					15
Asp	Ser	Ser	Ala	Ser	Ser	Pro	Trp	Ala	Pro	Pro	Gly	Thr	Val	Leu
				20					25					30
Pro	Cys	Pro	Thr	Ser	Val	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Gln	Arg	Arg	Pro
				35					40					45
Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
				50					55					60
Pro	Pro	Leu	Pro	Pro	Leu	Pro	Leu	Pro	Pro	Leu	Lys	Lys	Arg	Gly
				65					70					75
Asn	His	Ser	Thr	Gly	Leu	Cys	Leu	Leu	Val	Met	Phe	Phe	Met	Val
				80					85					90
Leu	Val	Ala	Leu	Val	Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Met	Phe	Gln	Leu	Phe
				95					100					105
His	Leu	Gln	Lys	Glu	Pro	Ser	Pro	Pro	Pro	Glu	Lys	Lys	Glu	Leu
				110					115					120
Arg	Lys	Val	Ala	His	Leu	Thr	Gly	Lys	Ser	Asn	Ser	Arg	Ser	Met
				125					130					135
Pro	Leu	Glu	Trp	Glu	Asp	Thr	Tyr	Gly	Ile	Val	Leu	Leu	Ser	Gly
				140					145					150
Val	Lys	Tyr	Lys	Lys	Gly	Gly	Leu	Val	Ile	Asn	Glu	Thr	Gly	Leu
				155					160					165

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn		
	170	175 180
Asn Leu Pro Leu Ser His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr		
	185	190 195
Pro Gln Asp Leu Val Met Met Glu Gly Lys Met Met Ser Tyr Cys		
	200	205 210
Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val		
	215	220 225
Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His Leu Tyr Val Asn Val Ser Glu		
	230	235 240
Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser Gln Thr Phe Phe Gly Leu		
	245	250 255
Tyr Lys Leu		
	258	

【0059】

配列番号：2

配列の長さ：277

配列の型：アミノ酸

配列の種類：タンパク質

配列：

Met Gln Gln Pro Phe Asn Tyr Pro Tyr Pro Gln Ile Tyr Trp Val		
1	5	10 15
Asp Ser Ser Ala Ser Ser Pro Trp Ala Pro Pro Gly Thr Val Leu		
	20	25 30
Pro Cys Pro Thr Ser Val Pro Arg Arg Pro Gly Gln Arg Arg Pro		
	35	40 45
Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro		
	50	55 60
Pro Pro Leu Pro Pro Leu Pro Leu Pro Pro Leu Lys Lys Arg Gly		

65	70	75
Asn His Ser Thr Gly Leu Cys Leu Leu Val Met Phe Phe Met Val		
80	85	90
Leu Val Ala Leu Val Gly Leu Gly Leu Gly Met Phe Gln Leu Phe		
95	100	105
His Leu Gln Lys Glu Leu Ala Glu Leu Arg Glu Ser Thr Ser Gln		
110	115	120
Met His Thr Ala Ser Ser Leu Gly His Pro Ser Pro Pro Pro Glu		
125	130	135
Lys Lys Glu Leu Arg Lys Val Ala His Leu Thr Gly Lys Ser Asn		
140	145	150
Ser Arg Ser Met Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val		
155	160	165
Leu Leu Ser Gly Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn		
170	175	180
Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly		
185	190	195
Gln Ser Cys Asn Asn Leu Pro Leu Ser His Lys Val Tyr Met Arg		
200	205	210
Asn Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met Met Glu Gly Lys Met		
215	220	225
Met Ser Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala Arg Ser Ser Tyr		
230	235	240
Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His Leu Tyr Val		
245	250	255
Asn Val Ser Glu Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser Gln Thr		
260	265	270
Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu		
275	277	

【0060】

配列番号：3

配列の長さ：281

配列の型：アミノ酸

配列の種類：タンパク質

配列：

Met	Gln	Gln	Pro	Phe	Asn	Tyr	Pro	Tyr	Pro	Gln	Ile	Tyr	Trp	Val
1				5						10				15
Asp	Ser	Ser	Ala	Ser	Ser	Pro	Trp	Ala	Pro	Pro	Gly	Thr	Val	Leu
				20						25				30
Pro	Cys	Pro	Thr	Ser	Val	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Gln	Arg	Arg	Pro
				35						40				45
Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
				50						55				60
Pro	Pro	Leu	Pro	Pro	Leu	Pro	Leu	Pro	Pro	Leu	Lys	Lys	Arg	Gly
				65						70				75
Asn	His	Ser	Thr	Gly	Leu	Cys	Leu	Leu	Val	Met	Phe	Phe	Met	Val
				80						85				90
Leu	Val	Ala	Leu	Val	Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Met	Phe	Gln	Leu	Phe
				95						100				105
His	Leu	Gln	Lys	Glu	Leu	Ala	Glu	Leu	Arg	Glu	Ser	Thr	Ser	Gln
				110						115				120
Met	His	Thr	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ala	Gln	Ile	Gly	His	Pro	Ser
				125						130				135
Pro	Pro	Pro	Glu	Lys	Lys	Glu	Leu	Arg	Lys	Val	Ala	His	Leu	Thr
				140						145				150
Gly	Lys	Ser	Asn	Ser	Arg	Ser	Met	Pro	Leu	Glu	Trp	Glu	Asp	Thr
				155						160				165
Tyr	Gly	Ile	Val	Leu	Leu	Ser	Gly	Val	Lys	Tyr	Lys	Lys	Gly	Gly

170	175	180
Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val		
185	190	195
Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Asn Leu Pro Leu Ser His Lys		
200	205	210
Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met Met		
215	220	225
Glu Gly Lys Met Met Ser Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala		
230	235	240
Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp		
245	250	255
His Leu Tyr Val Asn Val Ser Glu Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu		
260	265	270
Glu Ser Gln Thr Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu		
275	280	281

【 0 0 6 1 】

配列番号 : 4

配列の長さ : 7 7 4

配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列 :

ATG CAG CAG CCC TTC AAT TAC CCA TAT CCC CAG ATC TAC TGG GTG	45
GAC AGC AGT GCC AGC TCT CCC TGG GCC CCT CCA GGC ACA GTT CTT	90
CCC TGT CCA ACC TCT GTG CCC AGA AGG CCT GGT CAA AGG AGG CCA	135
CCA CCA CCA CCG CCA CCG CCA CCA CTA CCA CCT CCG CCG CCG CCG	180
CCA CCA CTG CCT CCA CTA CCG CTG CCA CCC CTG AAG AAG AGA GGG	225
AAC CAC AGC ACA GGC CTG TGT CTC CTT GTG ATG TTT TTC ATG GTT	270
CTG GTT GCC TTG GTA GGA TTG GGC CTG GGG ATG TTT CAG CTC TTC	315
CAC CTA CAG AAG GAG CCC AGT CCA CCC CCT GAA AAA AAG GAG CTG	360

AGG AAA GTG GCC CAT TTA ACA GGC AAG TCC AAC TCA AGG TCC ATG 405
 CCT CTG GAA TGG GAA GAC ACC TAT GGA ATT GTC CTG CTT TCT GGA 450
 GTG AAG TAT AAG AAG GGT GGC CTT GTG ATC AAT GAA ACT GGG CTG 495
 TAC TTT GTA TAT TCC AAA GTA TAC TTC CGG GGT CAA TCT TGC AAC 540
 AAC CTG CCC CTG AGC CAC AAG GTC TAC ATG AGG AAC TCT AAG TAT 585
 CCC CAG GAT CTG GTG ATG ATG GAG GGG AAG ATG ATG AGC TAC TGC 630
 ACT ACT GGG CAG ATG TGG GCC CGC AGC AGC TAC CTG GGG GCA GTG 675
 TTC AAT CTT ACC AGT GCT GAT CAT TTA TAT GTC AAC GTA TCT GAG 720
 CTC TCT CTG GTC AAT TTT GAG GAA TCT CAG ACG TTT TTC GGC TTA 765
 TAT AAG CTC 774

【0062】

配列番号：5

配列の長さ：831

配列の型：核酸

配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

ATG CAG CAG CCC TTC AAT TAC CCA TAT CCC CAG ATC TAC TGG GTG 45
 GAC AGC AGT GCC AGC TCT CCC TGG GCC CCT CCA GGC ACA GTT CTT 90
 CCC TGT CCA ACC TCT GTG CCC AGA AGG CCT GGT CAA AGG AGG CCA 135
 CCA CCA CCA CCG CCA CCG CCA CCA CTA CCA CCT CCG CCG CCG CCG 180
 CCA CCA CTG CCT CCA CTA CCG CTG CCA CCC CTG AAG AAG AGA GGG 225
 AAC CAC AGC ACA GGC CTG TGT CTC CTT GTG ATG TTT TTC ATG GTT 270
 CTG GTT GCC TTG GTA GGA TTG GGC CTG GGG ATG TTT CAG CTC TTC 315
 CAC CTA CAG AAG GAG CTG GCA GAA CTC CGA GAG TCT ACC AGC CAG 360
 ATG CAC ACA GCA TCA TCT TTG GGC CAC CCC AGT CCA CCC CCT GAA 405
 AAA AAG GAG CTG AGG AAA GTG GCC CAT TTA ACA GGC AAG TCC AAC 450
 TCA AGG TCC ATG CCT CTG GAA TGG GAA GAC ACC TAT GGA ATT GTC 495
 CTG CTT TCT GGA GTG AAG TAT AAG AAG GGT GGC CTT GTG ATC AAT 540
 GAA ACT GGG CTG TAC TTT GTA TAT TCC AAA GTA TAC TTC CGG GGT 585

CAA TCT TGC AAC AAC CTG CCC CTG AGC CAC AAG GTC TAC ATG AGG 630
 AAC TCT AAG TAT CCC CAG GAT CTG GTG ATG ATG GAG GGG AAG ATG 675
 ATG AGC TAC TGC ACT ACT GGG CAG ATG TGG GCC CGC AGC AGC TAC 720
 CTG GGG GCA GTG TTC AAT CTT ACC AGT GCT GAT CAT TTA TAT GTC 765
 AAC GTA TCT GAG CTC TCT CTG GTC AAT TTT GAG GAA TCT CAG ACG 810
 TTT TTC GGC TTA TAT AAG CTC 831

【0063】

配列番号：6

配列の長さ：843

配列の型：核酸

配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

ATG CAG CAG CCC TTC AAT TAC CCA TAT CCC CAG ATC TAC TGG GTG 45
 GAC AGC AGT GCC AGC TCT CCC TGG GCC CCT CCA GGC ACA GTT CTT 90
 CCC TGT CCA ACC TCT GTG CCC AGA AGG CCT GGT CAA AGG AGG CCA 135
 CCA CCA CCA CCG CCA CCG CCA CCA CTA CCA CCT CCG CCG CCG CCG 180
 CCA CCA CTG CCT CCA CTA CCG CTG CCA CCC CTG AAG AAG AGA GGG 225
 AAC CAC AGC ACA GGC CTG TGT CTC CTT GTG ATG TTT TTC ATG GTT 270
 CTG GTT GCC TTG GTA GGA TTG GGC CTG GGG ATG TTT CAG CTC TTC 315
 CAC CTA CAG AAG GAG CTG GCA GAA CTC CGA GAG TCT ACC AGC CAG 360
 ATG CAC ACA GCA TCA TCT TTG GAG GCA CAA ATA GGC CAC CCC AGT 405
 CCA CCC CCT GAA AAA AAG GAG CTG AGG AAA GTG GCC CAT TTA ACA 450
 GGC AAG TCC AAC TCA AGG TCC ATG CCT CTG GAA TGG GAA GAC ACC 495
 TAT GGA ATT GTC CTG CTT TCT GGA GTG AAG TAT AAG AAG GGT GGC 540
 CTT GTG ATC AAT GAA ACT GGG CTG TAC TTT GTA TAT TCC AAA GTA 585
 TAC TTC CGG GGT CAA TCT TGC AAC AAC CTG CCC CTG AGC CAC AAG 630
 GTC TAC ATG AGG AAC TCT AAG TAT CCC CAG GAT CTG GTG ATG ATG 675
 GAG GGG AAG ATG ATG AGC TAC TGC ACT ACT GGG CAG ATG TGG GCC 720
 CGC AGC AGC TAC CTG GGG GCA GTG TTC AAT CTT ACC AGT GCT GAT 765

CAT TTA TAT GTC AAC GTA TCT GAG CTC TCT CTG GTC AAT TTT GAG 810
GAA TCT CAG ACG TTT TTC GGC TTA TAT AAG CTC 843

【図面の簡単な説明】

【図1】 精製されたヒト可溶性Fasリガンドを示す図である。(A)はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による便関野結果を示す。(B)は可溶性FasLの細胞障害活性を示すグラフである。

【図2】 欠失や点変異を有するFasL構築の概要図である。

【図3】 形質転換体におけるヒトFasLの免疫的検出結果を示す図である。

【図4】 細胞表面上でのFasLの発現結果を示す図である。

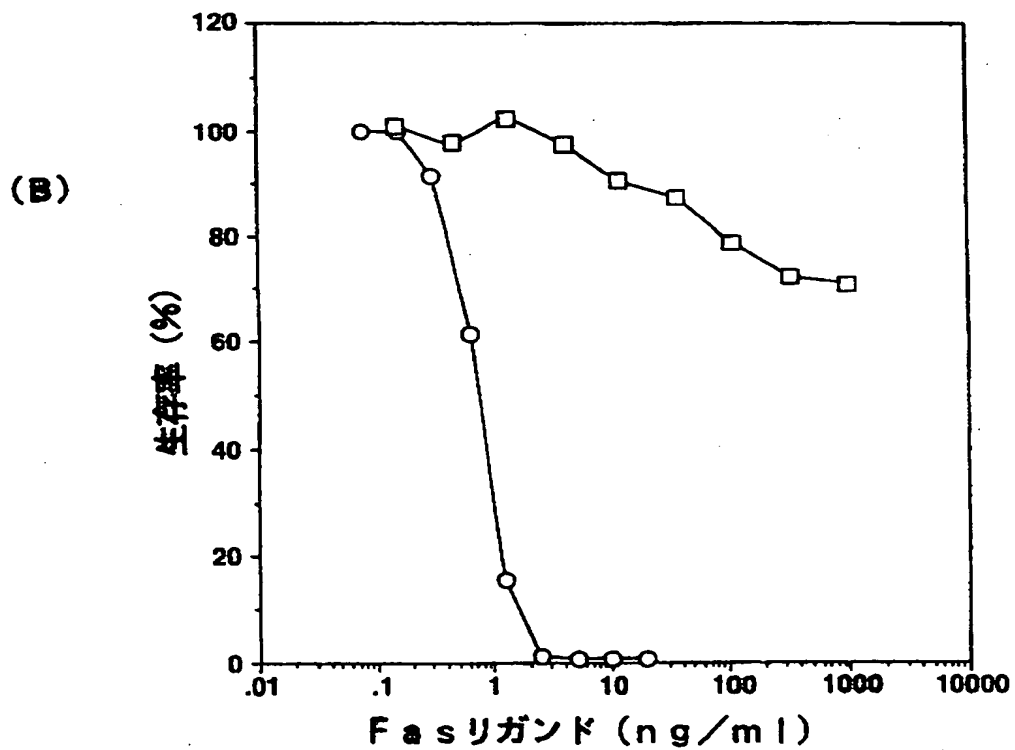
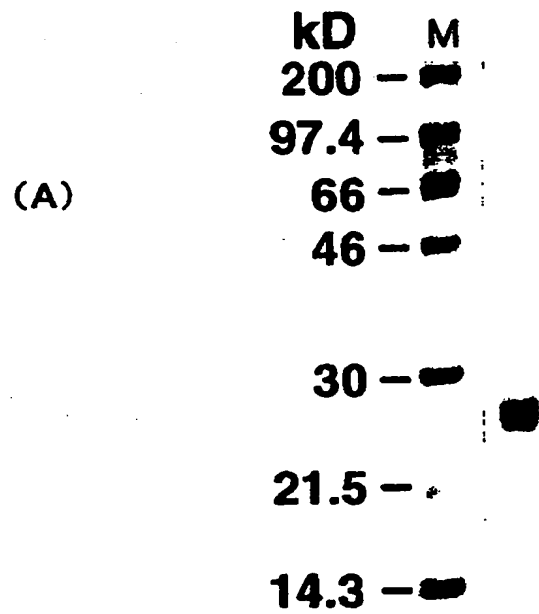
【図5】 膜結合型FasLのFasを過剰に発現するマウスW4細胞の細胞障害結果を示す図である。

【図6】 ヒトジャーカット細胞に対する膜結合型FasLの増大された細胞障害活性の結果を示す図である。

【図7】 (A)は肝細胞に対する可溶性FasLの細胞障害活性を示し、(B)はマウス肝細胞に対するFasLの細胞障害活性を示し、(C)は可溶性FasLによる膜結合型FasLの細胞障害活性結果を示す図である。

【書類名】 図面

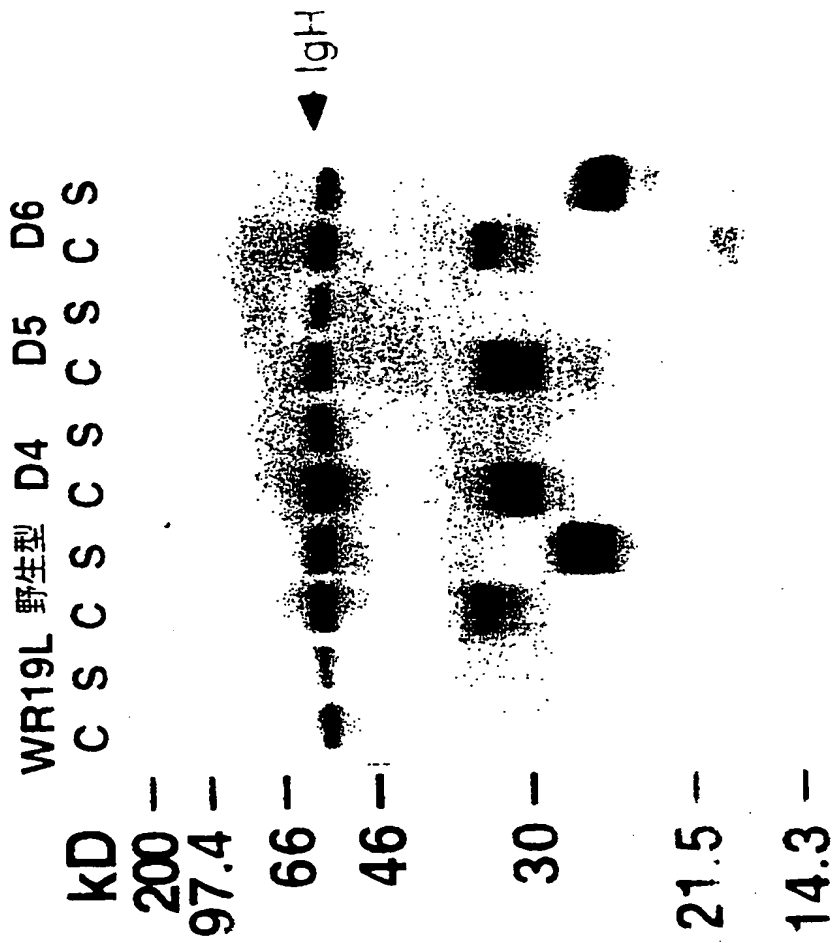
【図1】



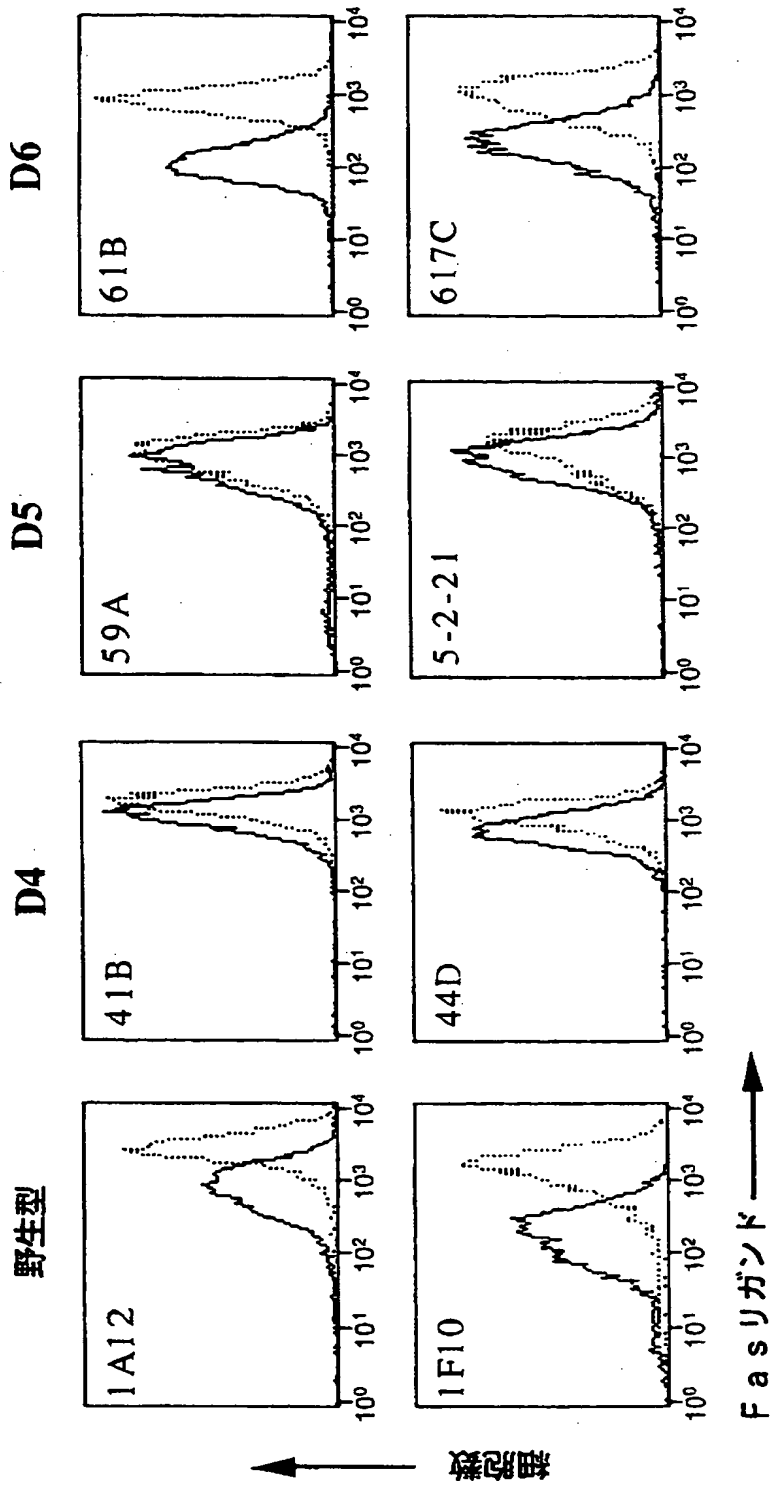
【図2】



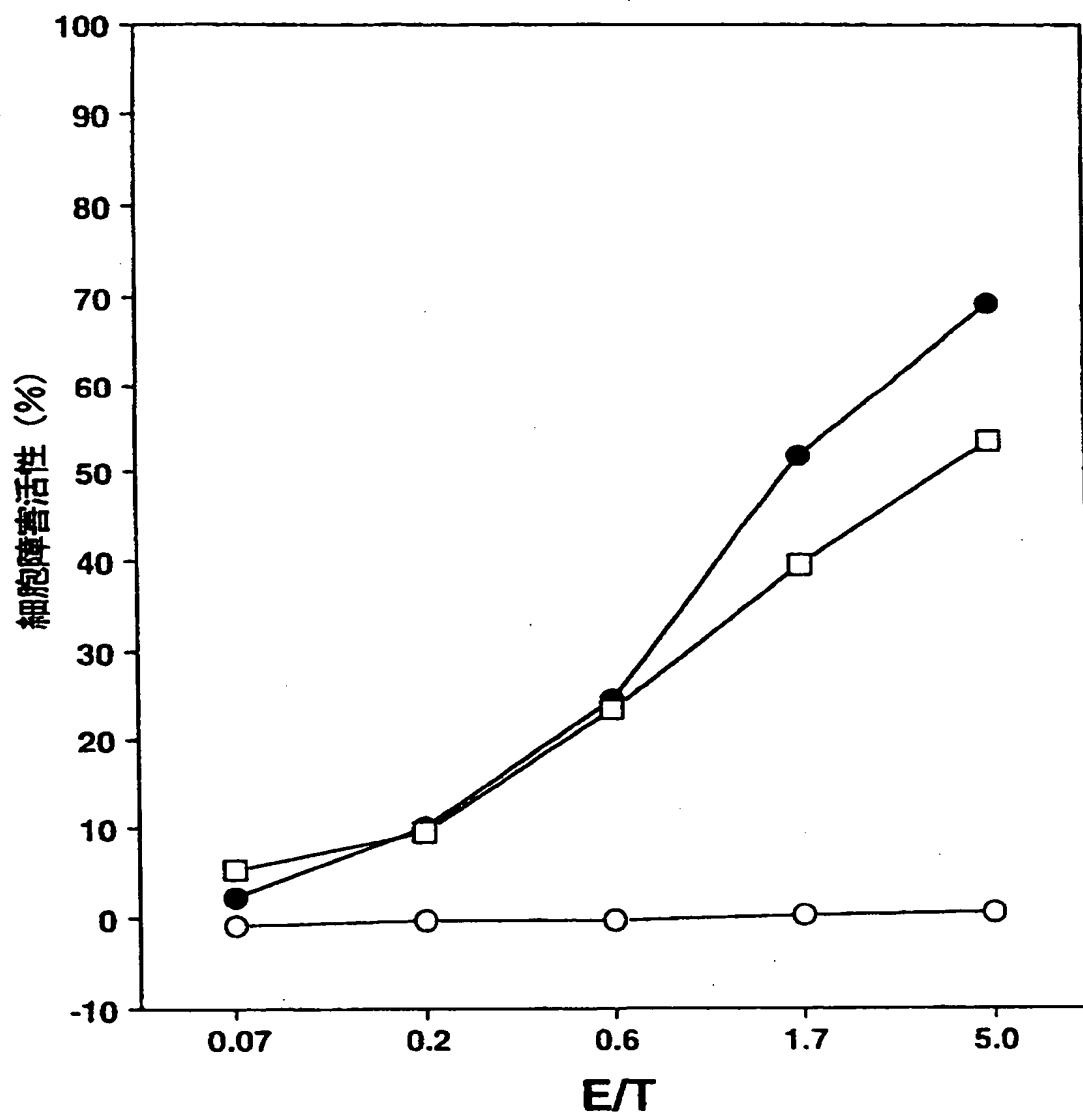
【図3】



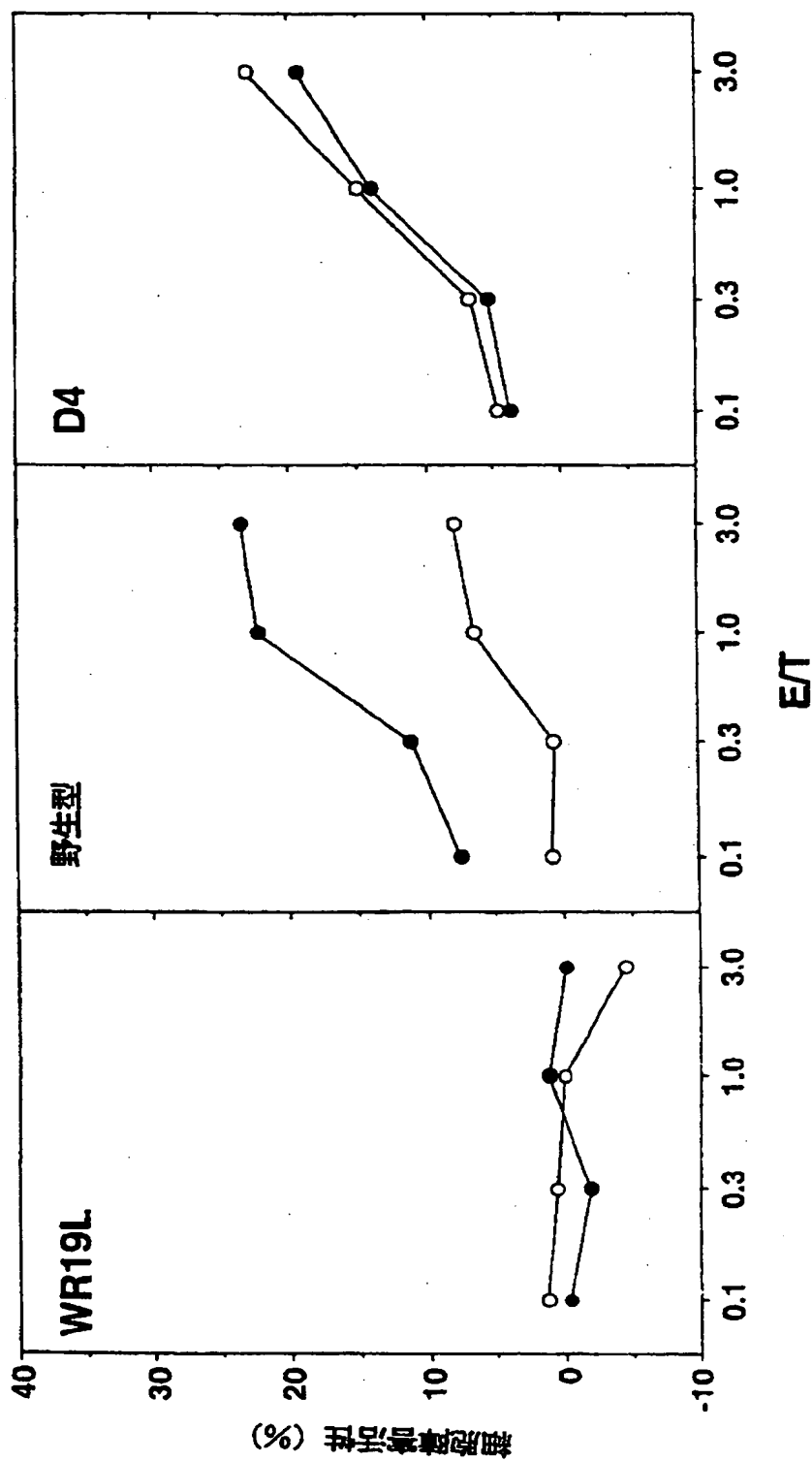
【図4】



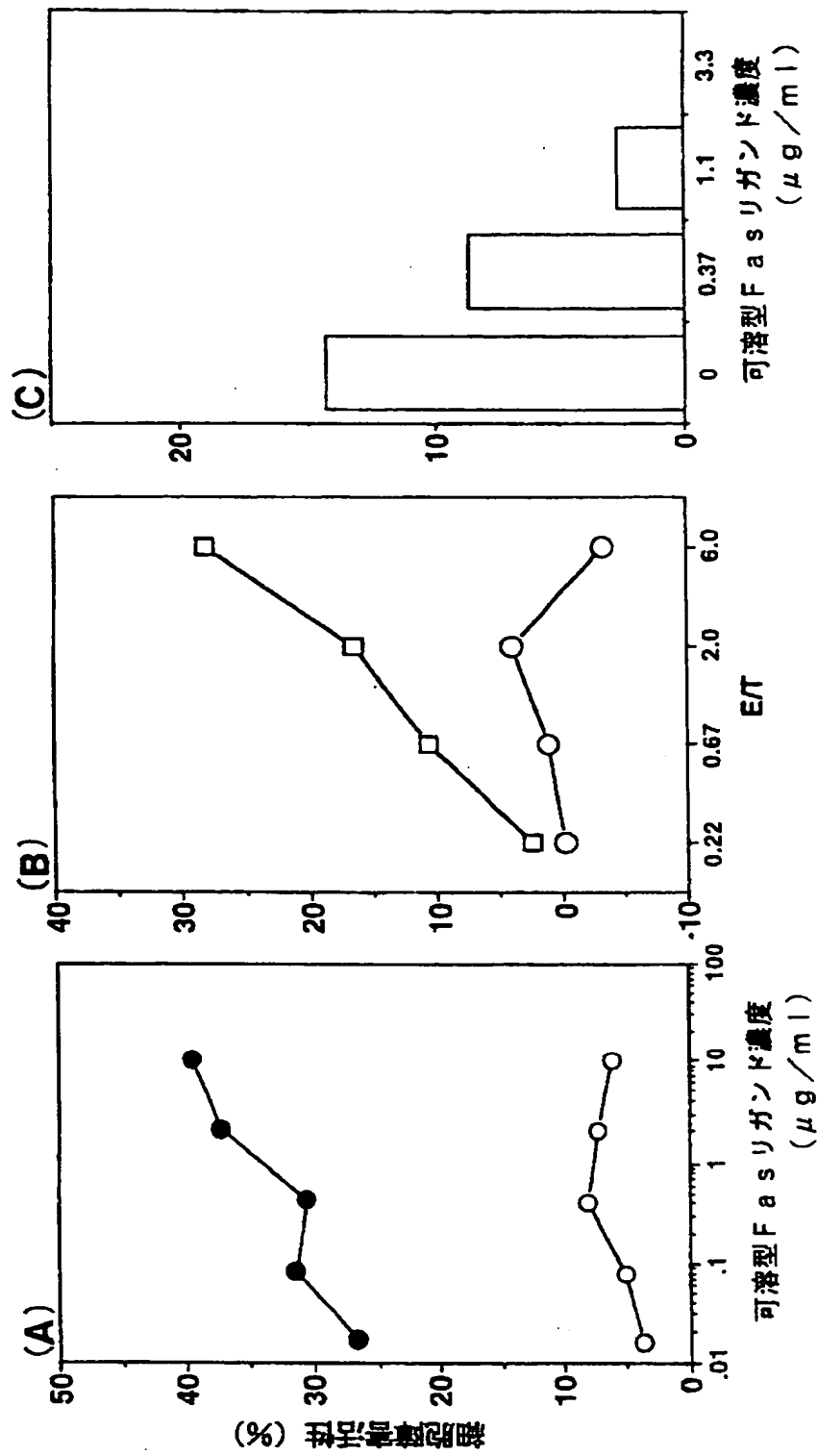
【図5】



【図6】



【図7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】本発明は、様々な疾患に関与するアポトーシスを制御することができるFasリガンドおよびDNAの提供。

【解決手段】可溶型Fasリガンドを含有するアポトーシス調節剤、新規Fasリガンド誘導体、および該新規Fasリガンド誘導体をコードするDNA。

【選択図】なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000181147
【住所又は居所】 東京都新宿区四谷1丁目7番地
【氏名又は名称】 持田製薬株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 390000745
【住所又は居所】 大阪府吹田市古江台6丁目2番4号
【氏名又は名称】 財団法人大阪バイオサイエンス研究所

【代理人】

【識別番号】 100080159
【住所又は居所】 東京都千代田区岩本町3丁目2番2号 千代田岩本ビル4階
【氏名又は名称】 渡辺 望稔

【選任した代理人】

【識別番号】 100090217
【住所又は居所】 東京都千代田区岩本町3丁目2番2号 千代田岩本ビル4階
【氏名又は名称】 三和 晴子

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000181147]

1. 変更年月日	1990年 8月29日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都新宿区四谷1丁目7番地
氏 名	持田製薬株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [390000745]

1. 変更年月日 1990年 9月21日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府吹田市古江台6丁目2番4号

氏 名 財団法人大阪バイオサイエンス研究所